

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/05811 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 7/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/06905**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Juli 2000 (19.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 33 701.2 19. Juli 1999 (19.07.1999) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE];**  
Grillparzerstrasse 10B, D-81675 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WILHELM, Olaf**  
[DE/DE]; Säbenerstrasse 188, D-81545 München  
(DE). **KESSLER, Horst [DE/DE];** Lörenskogstrasse  
4, D-85748 Garching (DE). **BÜRGLE, Markus [DE/DE];**  
Rudolf-Camrer-Strasse 1, D-81369 München (DE).  
**POTTHOFF, Nils [DE/DE];** Etzenhausenerstrasse 1b,  
D-85221 Dachau (DE). **SCHMIEDEBERG, Niko**  
[DE/DE]; Pienzenauerstrasse 1a, D-81679 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,**  
**AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,**  
**CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,**  
**HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,**  
**LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,**  
**MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,**  
**TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**  
**GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-**  
**sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),**  
**europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,**  
**FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent**  
**(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,**  
**SN, TD, TG).**
- Veröffentlicht:**  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



**WO 01/05811 A2**

(54) Title: **CYCLIC PEPTIDOMIMETIC UROKINASE RECEPTOR ANTAGONISTS**

(54) Bezeichnung: **ZYKLISCHE PEPTIDOMIMETISCHE UROKINASEREZEPTORANTAGONISTEN**

(57) Abstract: The invention relates to cyclic peptides which are used as inhibitors to prevent urokinase from bonding to a urokinase receptor. The cyclic peptides are suitable for use as pharmaceutical active ingredients to combat diseases which are mediated by urokinase and the receptor thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese zyklischen Peptide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.



.

.

.

.

.

## Zyklische peptidomimetische Urokinaserezeptorantagonisten

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren der Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor, die als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet sind, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden. Die erfindungsgemäßen Substanzen sind von der uPA-Sequenz abgeleitete Peptide und entfalten als Liganden des Urokinaserezeptors (uPAR) eine antagonistische Wirkung, und werden im folgenden als uPAR-Antagonisten bezeichnet.

15

Die Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) ist für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse verantwortlich, wie etwa den proteolytischen Abbau von extrazellulärem Matrixmaterial, das für die Invasibilität und Wanderung von Zellen sowie für die Geweberemodellierung notwendig ist. uPA bindet mit hoher Affinität ( $K_D = 10^{-10}$ - $10^{-9}$ M) an den membranständigen uPA Rezeptor (uPAR) auf der Zelloberfläche.

20

Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor ist an vielen invasiven biologischen Prozessen wie etwa der Metastasierung bösartiger Tumoren, der Trophoplastenimplantation, Entzündungen und Angiogenese beteiligt. Daher sind Antagonisten von uPAR in der Lage, die Invasivität, Metastasierung und Angiogenese von Tumoren zu hemmen. uPAR-Antagonisten können als Mittel zur Therapie invasiver und metastasierender Krebserkrankungen eingesetzt werden, bei denen uPA und uPAR an den invasiven Foci von Tumoren auftreten (Dano et al.: The receptor for urokinase plasminogen activator: Stromal cell involvement in extracellular proteolysis during cancer invasion, in: Proteolysis and Protein Turnover, Barrett, A. J. und Bond, J., HRSG, Portland Press, London, 1994, 239), z. B. bei Krebserkrankungen

30

- 2 -

von Brust, Lunge, Darm und Ovarien. Darüber hinaus können uPAR-Antagonisten auch für andere Zwecke eingesetzt werden, bei denen eine Hemmung der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen erforderlich ist, beispielsweise zur Bekämpfung von Krankheiten wie Arthritis, Entzündungen, Osteoporose, Retinopathien und zur Kontrazeption.

Der uPA Rezeptor ist in WO 90/ 12091 sowie in den Veröffentlichungen Ploug et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 17539 und Ronne et al., J. Immunol. Methods 167 (1994), 91 beschrieben.

uPA wird als einzelkettiges Molekül (pro-uPA) synthetisiert und enzymatisch in einen aktiven zweikettigen uPA überführt. Das uPA Molekül besteht aus drei strukturell unabhängigen Domänen, der N-terminal lokalisierten wachstumsfaktorartigen Domäne (GFD, uPA 1 - 46), einer Kringelstrukturdomäne (uPA 45 - 135) und der Serinproteasedomäne (uPA 159 - 411). GFD und die Kringeldomäne bilden zusammen das sogenannte aminoterminal Fragment von uPA (ATF, uPA 1 - 135), das durch weitere proteolytische Spaltung von zweikettigem uPA erzeugt wird. ATF bindet an den uPA Rezeptor mit einer ähnlichen Affinität wie uPA.

Die rezeptorbindende Region von uPA erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 12 bis 32, da ein Peptid, welches die Aminosäurereste 12 bis 32 von uPA enthält (wobei Cystein an Position 19 durch Alanin ersetzt ist) mit ATF um die Bindung an den uPA Rezeptor kompetiert (Appella et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 4437-4440). Weiterhin wurde dort gezeigt, daß dieses Peptid auch nach Zyklisierung durch Verbrückung der beiden Cysteinreste an den Positionen 12 und 32 eine Affinität für den uPA Rezeptor zeigt. In einem alternativen Ansatz wurden von Goodson et al., (Proc. Natl. Acad. USA 91 (1994), 7129-7133) antagonistische uPA-Peptide für den uPAR mittels Musterung einer Bakteriophagen-Peptidbibliothek identifiziert. Diese Peptide zeigten keine ersichtliche Sequenzhomologie zu der natürlichen uPAR-bindenden Sequenz von uPA.

- 3 -

In neueren Veröffentlichungen (Rettenberger et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (1995), 587-594); Magdolen et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 743-751; Goretzki et al., Fibrinolysis and Proteolysis 11 (1997), 11-19) sind weitere Untersuchungen an der uPAR-Bindungsregion des uPA beschrieben. Dabei wurden die Reste Cys19, Lys23, Tyr24, Phe25, Ile28, Trp30 und Cys31 als wichtige Determinanten für eine uPA/uPAR-Wechselwirkung identifiziert. Als wirksamster Inhibitor wurde in diesen Untersuchungen ein uPA-Peptid mit den Aminosäuren 16 bis 32 von uPA identifiziert.

Magdolen et al. (1996) supra, analysieren die uPAR-Bindungsregion des uPA-Moleküls unter der Verwendung eines Peptids mit den Aminosäuren 14 bis 32 von uPA und davon abgeleiteten Peptiden. Diese sowie auch die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Peptide (vgl. z.B. Appella et al. (1987) supra) weisen jedoch eine relativ geringe Affinität zum uPAR auf.

WO-A-94/22646 offenbart lineare Peptide mit einer Länge von 6 bis 18 Aminosäuren, die aus dem Bereich der Aminosäuren 14 bis 33 von uPA stammen. Es wird beschrieben, daß kurze von uPA abgeleitete Peptide (uPA 21-29 und uPA 21-26) in der Lage sind, das Wachstum von Keratinozyten zu beeinflussen. Zwar wird in WO-A-94/22646 auf einen möglichen Einsatz der beanspruchten Peptide für die Blockierung der uPA/uPAR-Wechselwirkung hingewiesen, es werden jedoch keinerlei Daten oder Hinweise auf derartige Bindungsstudien gezeigt. Darüber hinaus enthalten die als bevorzugt genannten linearen Peptide uPA 21-29 und uPA 21-26 nicht die minimale uPAR-Bindungsregion von linearen uPA-Peptiden, welche den Sequenzbereich der Aminosäuren 19 bis 31 umfaßt. Die Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten durch diese kurzen Peptide beruht somit sehr wahrscheinlich nicht auf einer uPA/uPAR-Wechselwirkung.

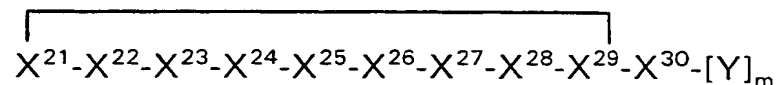
- 4 -

WO 98/46632 offenbart uPAR-Peptidinhibitoren, die vom linearen Peptid uPA (19-31) und zyklischen Derivaten davon abgeleitet sind und an ausgewählten Positionen D-Aminosäurereste tragen.

5 Ein Beispiel für einen solchen Peptidinhibitor ist das Peptid cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub>. Dieses Peptid besitzt eine bereits recht hohe Affinität für uPAR (IC<sub>50</sub> = 78nM), die nur noch um einen Faktor 4 geringer als die Affinität des aminoterminalen Fragments von uPA (ATF = Aminosäuren 1-135 der Urokinase) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 21 nM ist. Das entsprechende  
10 ausschließlich aus L-Aminosäuren zusammengesetzte Peptid cyclo[(21,29)-[Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> hat eine hundertfach geringe Aktivität im Vergleich zu ATF.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin,  
15 durch Einbau isostruktureller oder/und isofunktioneller natürlicher bzw. nichtnatürlicher Aminosäuren die Struktur des uPAR-Peptidinhibitors zu modifizieren und somit eine weitere Verbesserung hinsichtlich der Affinität für uPAR, der Serumstabilität oder/und der therapeutischen Wirkung zu erreichen.

20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



25

worin

$X^{21}-X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind,  
30 Y ein Spacer ist und m 0 oder 1 ist, und

- 5 -

die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,

5 mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste X<sup>21</sup>-X<sup>30</sup> der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebene Aminosäurereste ersetzt ist:

- X<sup>21</sup>: Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure  
10 (Dab), Penicillamin (Pen), D-Pen, Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;  
X<sup>22</sup>: Gln, Asp, Glu;  
X<sup>23</sup>: Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);  
X<sup>24</sup>: Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-  
carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-  
15 Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal), Cha  
(Cyclohexylalanin);  
X<sup>25</sup>: Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;  
X<sup>26</sup>: Thr, Val, Homoserin (Hse);  
X<sup>27</sup>: Gln, Asp, Glu;  
20 X<sup>28</sup>: Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle), Norvalin  
(Nva), Nle,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib), Cha;  
X<sup>29</sup>: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;  
X<sup>30</sup>: Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure (Oic),  
His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Tryptamin, Tryptophanamid (Trp-  
25 NH<sub>2</sub>).

Bevorzugt sind Peptide, bei denen mindestens einer der Aminosäurereste X<sup>21</sup>-X<sup>30</sup> der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- 30 X<sup>21</sup>: D-Pen;  
X<sup>22</sup>: Gln;  
X<sup>23</sup>: Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

- 6 -

- $X^{24}$ : Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;  
 $X^{25}$ : Thi;  
 $X^{27}$ : Asp;  
 $X^{28}$ : Nle, Val, Cha;  
 $X^{29}$ : Pen;  
 $X^{30}$ : Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia, Trp-NH<sub>2</sub>.

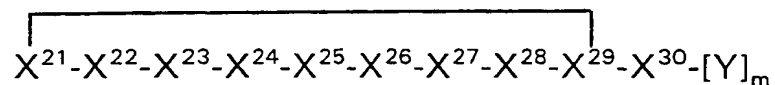
Besonders bevorzugt sind Peptide, in denen mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- $X^{21}$ : D-Pen;  
 $X^{23}$ : Arg, Nle, Cit, Hci;  
 $X^{24}$ : Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;  
 $X^{25}$ : Thi;  
 $X^{28}$ : Nle, Cha;  
 $X^{29}$ : Pen;  
 $X^{30}$ : Trp-NH<sub>2</sub>.

Y ist eine Spacergruppe, z. B. eine aus einer oder mehreren Aminosäuren aufgebaute peptidische Spacergruppe, z.B. Poly-Lys, oder eine andere Spacergruppe, z.B. eine Polyethylenglykolgruppe. Das Peptid kann über die Gruppe Y an Trägersubstanzen gekoppelt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Peptide mit einem neungliedrigen Ring, wobei mindestens 2, vorzugsweise mindestens 3 und besonders bevorzugt mindestens 4 der den Ring bildenden Aminosäurereste eine Sequenz aus der uPA-Region 22 bis 28 aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):





- 7 -

worin

$X^{21}$ - $X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind,   
 5  $Y$  ein Spacer ist und  $m$  0 oder 1 ist, und

die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet,   
 10 und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,

mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest ersetzt ist, wobei die resultierenden Verbindungen vorzugsweise eine erhöhte   
 15 Proteasestabilität, insbesondere eine erhöhte Stabilität gegenüber physiologischen Proteasen, z.B. im Blut oder Gewebe vorkommenden Proteasen, wie etwa Plasmin oder/und im Verdauungstrakt vorkommenden Proteasen wie etwa Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin im Vergleich zur Leitstruktur aufweisen. Vorzugsweise ist zumindest der Aminosäurerest   
 20 Lys<sup>23</sup> durch eine nicht-proteinogene Aminosäure, d.h. durch eine nicht genetisch kodierte Aminosäure wie etwa Orn, Dap, Dab, Cit, Hci oder Nle ersetzt.

Neben Peptiden der Strukturformel (I) sind auch pharmazeutisch verträgliche   
 25 Salze und Derivate davon als uPAR-Antagonisten geeignet. Als Derivate kommen dabei insbesondere solche Verbindungen in Betracht, die an reaktiven Gruppen der Seitenkette oder/und des N- bzw. C-Terminus, z. B. an Amino- oder Carbonsäuregruppen, modifiziert sind. Beispiele für solche Modifikationen sind eine Acylierung, z. B. eine Acetylierung von   
 30 Aminogruppen oder/und eine Amidierung oder Veresterung von Carbonsäuregruppen, z.B. eine Amidierung der C-terminalen Aminosäure.

- 8 -

Die monomeren Bausteine sind über Säureamidbindungen  $\text{NR}^1\text{CO}$  oder  $\text{CONR}^1$  verknüpft, d. h. die Peptidsequenzrichtung kann umgekehrt werden (Retropeptide).  $\text{R}^1$  kann wie in nativen Polypeptiden Wasserstoff bedeuten. Andererseits kann  $\text{R}^1$  jedoch auch einen Alkylrest, z. B. Methyl oder Ethyl, und insbesondere Methyl bedeuten, da durch eine N-Alkylierung der Amidbindung oftmals eine starke Aktivitätsbeeinflussung bewirkt werden kann (vgl. z. B. Levian-Teitelbaum et al., Biopolymers 28 (1989), 51-64). Als monomere Bausteine werden die  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren - sofern nicht anders angegeben - in Form von L-Enantiomeren eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Verbindungen, wobei die monomeren Bausteine  $\text{X}^{21}$  und  $\text{X}^{29}$  miteinander verbrückt sind. Diese Verbrückung kann beispielsweise über die Seitenketten der jeweiligen  $\alpha$ -Aminocarbonsäurereste erfolgen, wobei eine Verbrückung über Disulfidbindungen, z. B. zwischen zwei Cysteinresten besonders bevorzugt ist. Andere Arten der Zyklisierung zwischen Aminosäureseitenketten sind jedoch auch möglich, z. B. Amidbindungen zwischen einer Aminosäure mit einer Aminoseitengruppe, z. B. Ornithin oder Lys und einer Aminosäure mit einer Carbonsäureseitengruppe wie etwa Asp oder Glu. Weiterhin kann die Disulfidbrücke auch durch eine Alkylen-Brücke ersetzt werden, um die chemische Stabilität zu erhöhen. Darüber hinaus sind auch Verknüpfungen von einer Aminosäureseitenkette mit dem Peptidrückgrat, z. B. Verknüpfung einer Aminoseitengruppe, z.B. einer  $\omega$ -Aminoseitengruppe, mit dem C-terminalen Ende bzw. Verknüpfung einer Carbonsäureseitengruppe mit dem N-terminalen Ende möglich. Auch eine Verknüpfung von N- und C-Terminus ist möglich. Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch chemische Synthese wie in den Beispielen erläutert erhältlich.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens ein Peptid oder Polypeptid wie zuvor definiert gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält. Insbesondere werden die

erfindungsgemäßen Peptide oder Polypeptide zur Herstellung von uPAR-Antagonisten verwendet, die sich auch zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung eignen. Weiterhin können erfindungsgemäße Peptide -  
5 ebenso wie die Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> als Inhibitoren der Angiogenese eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen uPAR-Peptidantagonisten zur Herstellung von  
10 Targetingvehikeln, z.B. Liposomen, viralen Vektoren etc., für uPAR-exprimierende Zellen. Das Targeting kann für diagnostische Anwendungen zum gesteuerten Transport von Markierungsgruppen, z.B. radioaktiven oder nichtradioaktiven Markierungsgruppen erfolgen. Andererseits kann das Targeting für therapeutische Anwendungen, z.B. zum Transport von  
15 pharmazeutischen Wirkstoffen, beispielsweise auch zum Transport von Nukleinsäuren für die Gentherapie erfolgen.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können in beliebiger Form vorliegen, beispielsweise als Tabletten, als beschichtete  
20 Tabletten oder in Form von Lösungen oder Suspensionen in wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmitteln. Die Peptide werden vorzugsweise oral oder parenteral in einer flüssigen oder festen Form verabreicht. Bei Verabreichung in flüssiger Form wird Wasser vorzugsweise als Trägermedium verwendet, das gegebenenfalls Stabilisatoren, Löslichkeitsvermittler oder/und Puffer  
25 enthält, die üblicherweise für Injektionslösungen verwendet werden. Solche Zusatzstoffe sind beispielsweise Tartrat- oder Boratpuffer, Ethanol, Dimethylsulfoxid, Komplexierungsmittel wie etwa EDTA, Polymere wie etwa flüssiges Polyethylenoxid, etc.

Bei Verabreichung in fester Form können feste Trägersubstanzen wie etwa  
30 Stärke, Lactose, Mannitol, Methylcellulose, Talkum, hochdisperses Siliciumoxid, hochmolekulare Fettsäuren wie etwa Stearinsäure, Gelatine,

- 10 -

Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette oder feste hochmolekulare Polymere wie etwa Polyethylenglykole eingesetzt werden. Weiterhin können die Formulierungen zu oralen Applikation sofern gewünscht auch Aroma- und Süßstoffe enthalten.

5

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können auch in Form von Komplexen vorliegen, z.B. mit Cyclodextrinen wie etwa  $\gamma$ -Cyclodextrin. Die verabreichte Dosis hängt vom Alter, Gesundheitszustand und Gewicht des Patienten, von der Art und der Schwere der Erkrankung, 10 von der Art der Behandlung, von der Häufigkeit der Verabreichung und der Art der gewünschten Wirkung ab. Die tägliche Dosis der aktiven Verbindung ist üblicherweise 0,1 bis 50 mg/Kilogramm Körpergewicht. Normalerweise sind 0,5 bis 40 und vorzugsweise 1,0 bis 20 mg/kg/Tag in einer oder mehreren Dosen ausreichend, um die gewünschten Wirkungen zur 15 erreichen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die im Nachfolgenden beschriebenen Beispiele und Figuren erläutert werden.

20 Es zeigen:

Figur 1 den Vergleich der Affinität der Peptide cyclo[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und cyclo[21-29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (a) bzw. cyclo[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]uPA<sub>21-30</sub> und dem entsprechenden Peptid-Amid(b) 25

Figur 2 IC<sub>50</sub>-Werte von Modifikationen der Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub>;

30 Figur 3 eine schematische Darstellung für bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur;

- 11 -

Figur 4 die Stabilität der Peptide cyclo[19,31]-uPA<sub>16-32</sub>,  
cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Tic<sup>25</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und  
cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> in Humanserum (a) und  
heparinisiertem Humanblut (b);

5

Figur 5 die Plasmin-Resistenz von uPA-Peptiden nach Substitution von  
Lys<sup>23</sup> durch nicht-proteinogene Aminosäuren.

## Beispiele

10

### 1. Methoden

#### 1.1 Festphasenpeptidsynthese

15 Lineare Peptide wurden auf einem 2-Chlortritylharz (Barlos et al., Int. J. Pept. Protein Res. 37 (1991), 513 bis 520) oder einem Tritylchlorid-Polystyrolharz unter Verwendung eines Applied Biosystems Modell 431 A Peptidsynthesizers bzw. eines multiplen Peptidsynthesizers Modell Syro II (MultiSynTech) synthetisiert. Unter Anwendung der orthogonalen Fmoc-  
20 Strategie (Carpino und Han, J. Org. Chem. 37 (1972), 3404-3409; Fields und Noble, Int. J. Peptide Protein Res. 35 (1990), 161-214) wurden die Aminosäureseitenketten mit den Schutzgruppen Trityl (Asn, Cys, Gln und His), tert.-Butyloxycarbonyl (Lys und Trp), tert.-Butyl (Asp, Glu, Ser, Thr und Tyr), Acetamidomethyl (Cys) und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sul-  
25 fonyl oder 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Arg) blockiert. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur in Dimethylformamid unter Verwendung eines dreifachen Überschusses von 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat/1-Hydroxybenzotriazol/Fmoc-Aminosäure mit 2,5 Äquivalenten von N-Ethyl-diisopropylamin in N-Methyl-  
30 pyrrolidon. Die Fmoc-Gruppe wurde durch sequenzielle Behandlung der Harze mit einem Überschuß von 40 % bzw. 20 % Piperidin in Dimethylformamid entfernt. Die Abspaltung der Peptide und die Entfernung der

- 12 -

Seitenkettenschutzgruppen wurde gleichzeitig durch Behandlung mit 93 % Trifluoressigsäure/5 % Triisopropylsilan/3 % H<sub>2</sub>O (0 °C/1 h; Raumtemperatur/1h) durchgeführt. Im Fall von mit 2,2,5,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-geschützten Arg-Gruppen wurden die Peptide für zusätzliche 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die rohen Peptide wurden mit Diethylether bei -30 °C präzipitiert, in Methanol gelöst, wie zuvor präzipitiert, in tert.-Butanol gelöst und lyophilisiert. Tryptophan enthaltende Peptide wurden zusätzlich mit 5 % Essigsäure für 2 h vor der Lyophilisierung behandelt.

Die Peptide wurden durch HPLC unter Verwendung einer Reverse Phase C-18 Säule (Nucleosil 1005-C18) oder einer YMC-Pack ODS Säule gereinigt. Die Zyklisierung erfolgte durch eine Disulfidbrückenbildung. Die hierzu erforderliche Oxidation wurde durch Aufnehmen von 0,1 bis 0,3 mg/ml der gereinigten linearen Peptide in 80 % Wasser und 20 % DMSO (Vol/Vol) und Entfernen des Lösungsmittels unter verringertem Druck nach 10 h durchgeführt. Die zyklischen Peptide wurden erneut durch HPLC wie zuvor beschrieben gereinigt.

## 1.2 Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse

Die gereinigten und entsalzten Peptide wurden auf dem HPLC-System 140 B (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die UV-Absorption wurde mit einem UVIS 200 Detektor (Linear Instruments, Reno, USA) bei 206 nm gemessen. Die Chromatographie erfolgte auf einer Aquapore 3  $\mu$  (Applied Biosystems, Foster City, USA) Reverse Phase Säule (1 mm x 50 mm) mit einer Durchflußrate von 20  $\mu$ l/min. Das Lösungsmittelsystem war 0,1 % TFA in Wasser (A) und 0,1 % TFA in Acetonitril (B). Das HPLC System war an eine Atmosphärendruck-Ionisationsquelle gekoppelt, die an ein Tandem-Quadrupolinstrument API III (Sciex, Perkin Elmer, Thornhill, Kanada) angeschlossen war.

- 13 -

Die Quadrupol M/Z-Skala wurde mit den Ammoniumadduktionen von Polypropylenglykol kalibriert. Die durchschnittlichen Massenwerte wurden von den M/Z-Peaks in den Ladungsverteilungsprofilen der mehrfach geladenen Ionen berechnet (Covey et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988), 249-256; Fenn et al., Science 246 (1989), 64-71).

Die Aminosäureanalyse wurde nach der Ninhydrinmethode unter Verwendung des Analysesystems 6300 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) nach Hydrolyse der Peptide durch die TFA-HCl-Dampfphasenmethode (Tsugita et al., J. Biochem. 102 (1987), 1593-1597) durchgeführt, die eine quantitative Bestimmung der Peptidkonzentration erlaubt.

### 1.3 Durchflußzytometrie

Die Kapazität der synthetischen Peptide zu Hemmung der uPA/uPAR-Wechselwirkung wurde mittels Durchflußzytometrie an dem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der humanen Promyeloidzelllinie U937 als Quelle für zellulären nativen uPAR bestimmt (Chuchulowski et al., Fibrinolysis 6, Suppl. 4 (1992), 95-102; Magdolen et al., (1996), supra). Die U937 Zellen wurden mit 1 mM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 h stimuliert. Nach Stimulierung mit PMA exprimieren die U937 Zellen beträchtliche Mengen an zelloberflächenassoziiertem uPAR.

Die stimulierten Zellen wurden mit 50 mM Glycin-HCl, 0,1 NaCl, pH 3,6 für 1 min bei Raumtemperatur behandelt, um endogenen rezeptorgebundenen uPA zu dissoziieren. Anschließend wurde der saure Puffer durch 0,5 M HEPES-100 mM NaCl, pH 7,5 neutralisiert. Die Zellen wurden dann sofort zweimal mit PBS/0,1 % Rinderserumalbumin (RSA) gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS/0,1 % RSA resuspendiert, auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt und simultan mit 16 ng FITC-konjugiertem pro-uPA und

- 14 -

unterschiedlichen Mengen der synthetischen Peptide für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse wurde Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet, zu jeder Probe gegeben, um die Lebensfähigkeit der analysierten U937 Zellen zu bestimmen. Die beschädigten, Propidiumiodid-markierten Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

#### 1.4 Festphasen uPAR/uPA-Bindetest

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Analysen wurde ein Festphasen ATF-Ligandenbindetest zur Untersuchung der Wechselwirkungen von synthetischen Peptiden mit uPAR durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit rekombinantem humanem uPAR aus CHO Zellen (Wilhelm et al., FEBS Lett. 337 (1994), 131-134; Magdolen et al., Elektrophoresis 16 (1995), 813-816) beschichtet und die restlichen proteinbindenden Stellen mit 2 % RSA (Gew/Vol) abgesättigt. Nach Inkubation mit den Proben (0,6 ng ATF zusammen mit 15 µg synthetisches Peptid pro ml) und mehrfachen Waschschritten wurde die Menge an ATF, die an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten uPAR gebunden hatte, unter Verwendung eines biotinylierten monoklonalen Mausantikörpers gegen die Kringeldomäne von ATF (Nr. 377, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) und anschließender Zugabe von Avidin-Peroxidase-Konjugat und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat für die Peroxidase bestimmt. Das Vorhandensein von synthetischen Peptiden, die mit der ATF-Bindung an uPAR kompetieren, verringert den Umsatz des chromogenen Substrats.

#### 1.5 Bestimmung der Stabilität von Peptiden in Körperflüssigkeiten

Die Stabilität von uPA-abgeleiteten Peptiden in humanem Serum oder Vollblut wurde in vitro getestet.



- 15 -

Für die Präparation von Humanseren wurde venöses Blut ohne Antikoagulans in Polypropylen-Röhrchen bei 37°C 45 min gerinnen gelassen. An der Gefäßwand anhaftende Gerinnsel wurden mit einem Plastikstäbchen abgelöst und bei 1200 x g 12 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das  
5 überstehende Serum wurde abgenommen und entweder frisch für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt oder aliquotiert bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

Für Stabilitätsuntersuchungen in humanem Vollblut wurde venöses Blut  
10 durch Heparin-Natrium (1000 I.E. je 10 ml Vollblut) gerinnungsgehemmt und frisch verwendet. Die zu prüfenden Peptide wurden in Form von Peptidgemisch-Stammlösungen ( $\geq 1 \mu\text{g}$  je Peptid in  $\text{H}_2\text{O}$ ) den Körperflüssigkeiten in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  Serum bzw.  $200 \mu\text{l}$  Vollblut (je Peptid) zugefügt und für verschiedene Zeiten bei 37°C  
15 inkubiert. Vor der Analyse durch HPLC wurden Vollblutinkubationen 5 min bei Raumtemperatur  $16.000 \times g$  zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen.

Seren und Plasmen wurden vor der HPLC-Analytik über HLB-Vorsäulen  
20 (Waters GmbH, Oasis HLB extraction cartridge  $1\text{cm}^3/30 \text{ mg}$ ) vorgereinigt. Dazu wurden  $100 \mu\text{l}$  der Flüssigkeiten mit PBS auf 1 ml verdünnt und auf die mit 1 ml 100% Methanol und 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  konditionierte HLB-Vorsäulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 1 ml 5% Methanol in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und mit 1 ml 100% Methanol eluiert. Von dem Eluat wurden die ersten  
25  $200 \mu\text{l}$  (4 Tropfen) als Totvolumen verworfen. Die folgenden  $500 \mu\text{l}$  Eluat wurden mit  $500 \mu\text{l}$  PBS verdünnt und HPLC-analysiert. Die restlichen  $300 \mu\text{l}$  des Eluats wurden verworfen. Die HPLC-Analytik wurde durchgeführt mit einer YMC-5  $\text{C}_{18}$  analytischen Säule und einem 20-60% Gradienten aus  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure über  
30 30 min und Detektion der Analyten bei 220 nm.

## 1.6 Bestimmung der Protease-Resistenz

- 16 -

Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen den Angriff verschiedener Proteasen des Verdauungstrakts wurde mit gereinigten Enzymen unter geeigneten Pufferbedingungen in vitro durchgeführt. Generell wurden 10 µg Peptid in einem Volumen von 100 µl 30 min bei 37°C mit 2 µg Protease unter den vom Hersteller für die Aktivitätskontrollen angegebenen Pufferbedingungen inkubiert. Nach Inkubation wurden die Ansätze nach Verdünnung mit 300 µl H<sub>2</sub>O ohne Vorreinigung über eine Vorsäule direkt durch HPLC mit einem 20-60% Gradienten aus H<sub>2</sub>O, 0,1 % Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure analysiert.

Pepsin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde mit Peptiden in 52 mM HCl inkubiert. Inkubationen mit Trypsin (Sigma) wurde in 63 mM Natriumphosphat pH 7,6 durchgeführt. Chymotrypsine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (ICN) wurden in 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 40 mM Tris/Cl pH 7,8 inkubiert. Mit bakterieller Proteinase K wurde in ungepuffertem Wasser inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Peptid cyclo[19,31]-uPA<sub>16-32</sub>, das mit Ausnahme der Cysteinverbrückung der Originalsequenz des uPA-Omega-Loops entspricht, eingesetzt. Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen die Gewebeprotease Plasmin (Sigma) wurde in Ansätzen mit 10 oder 5 µg Peptiden und 0,05 U Plasmin in 100 µl 200 mM Natriumphosphat pH 7,5 bei 37°C und einer Inkubationsdauer von 30 min getestet.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29]

#### [D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub>

Figur 1a zeigt die inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29] [D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub> im Vergleich zu dem ausschließlich aus L-Aminosäuren bestehenden zyklischen Peptid cyclo[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Der IC<sub>50</sub> Wert des zyklischen Peptids mit D-Cys an Position 21 wurde mit 78 nM bestimmt, während der IC<sub>50</sub> Wert des nur aus L-Aminosäuren

- 17 -

zusammengesetzten zyklischen Peptids mit 2260 nM bestimmt wurde. Der  $IC_{50}$  Wert des aminoterminalen Fragments von uPA (Aminosäuren 1 bis 135 von uPA) liegt im Vergleich dazu bei 21 nM.

## 5      2.2 Synthese von modifizierten uPA Peptiden

Unter Verwendung von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub> als Leitstruktur wurden weitere zyklische Peptide hergestellt, in denen bestimmte Aminosäuren durch andere, insbesondere nicht-proteinogene Aminosäuren  
10      substituiert wurden. Die relativen Aktivitäten im Vergleich zur Leitstruktur sind in Figuren 1b und 2 gezeigt.

Figur 3 zeigt Beispiele für besonders bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur.

15

## 2.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von Peptiden in humanem Serum und Vollblut

Es wurde die Stabilität der Peptide cyclo[19,31]-uPA<sub>16-32</sub> (A),  
20      cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Tic<sup>25</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (B) und cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (C) in Humanserum und heparinisiertem Humanblut getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Figur 4a und 4b gezeigt. Die Peaks bei 20,5 min entsprechen dem Peptid A, die Peaks bei 23,0 min entsprechen dem Peptid B und die Peaks bei 24,9 min entsprechen dem  
25      Peptid C.

Zur Untersuchung der Stabilität der Peptide in humanem Serum (Fig. 4a) wurde ein Gemisch von jeweils 12,5 µg der Peptide zu rund 250 µl Serum gegeben. 100 µl davon wurden mit PBS auf 1 ml verdünnt, auf einer HLB-  
30      Vorsäule vorgereinigt und sofort durch HPLC analysiert (mittleres Profil). Weitere 100 µl wurden nach 20,5 h Inkubation bei 37°C (unteres Profil) analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils 5 µg der Peptide mit 1 ml PBS

- 18 -

versetzt und analysiert (oberes Profil). Der Peak bei 21,2 min entspricht einem nicht identifizierten Metaboliten.

5 Zur Untersuchung der Stabilität in heparinisierem Humanblut (Figur 4b) wurden 37,5 µg der Peptide mit 750 µl frisch präpariertem heparinisierem Humanblut versetzt. 375 µl wurden sofort danach abzentrifugiert. 100 µl des Plasmaüberstands wurden analysiert (mittleres Profil). Die restlichen 375 µl wurden für 20,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend analysiert (unteres Profil). Als Kontrolle wurden bereits 5 µg  
10 der Peptide mit 1 ml PBS versetzt und analysiert (oberes Profil).

Nach 20,5 h Inkubation in humanem Serum bei 37°C konnte das Peptid A (cyclo[19,31]-uPA<sub>16-32</sub>) nicht mehr nachgewiesen werden. Statt dessen erschien ein neuer Peak mit relativ verlängerter Retentionszeit (Abb. 4a  
15 unterstes HPLC-Profil, RT 21,233 min), der vermutlich einem Metaboliten von A entspricht. Die relativen Retentionszeiten und Peak-Integrale der Peptide B (cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Tic<sup>25</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>) und C (cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>) blieben dagegen nach Exposition gegen Humanserum annähernd gleich. Daraus kann auf eine unveränderte chemische Identität  
20 und Konzentration der beiden Peptide nach 20,5-stündiger Exposition gegen Humanserum geschlossen werden.

Auch die Exposition der Peptide gegen frisch isoliertes heparinisieretes Vollblut über 20,5 h zeigte die Instabilität von A. In diesem Fall konnte  
25 weder die unveränderte Substanz noch ein vermuteter Metabolit detektiert werden. Demgegenüber erschienen die Peaks der Peptide B und C im Humanblut stabil. Der Peak von A erscheint im Vergleich mit der PBS-Kontrolle bereits in der unmittelbar nach Zugabe zum Vollblut aufgearbeiteten und analysierten Probe wesentlich reduziert. Offenbar  
30 genügte die kurze Zeitspanne zwischen Zugabe der Peptide und Vorreinigung auf Vorsäulen (10-15 min) aus, einen wesentlichen Teil der zugefügten Peptidmenge (>80%) abzubauen.

- 19 -

Die Peak-Integrale der beiden D-Cys-Derivate B und C aus Plasma sind deutlich größer als in der PBS-Kontrolle, obwohl sie bezogen auf die Gesamtvolumina von PBS und Vollblut in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Nach Inkubation wurden die Peptide aber nur im Plasma nach  
5 Entfernung der Blutkörperchen analysiert. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß die D-Cys-Derivate sich vorwiegend im Plasma verteilen, aber nicht signifikant in Blutzellen eindringen können bzw. binden können.

#### 2.4 Stabilität von uPA-Peptiden gegen Plasmin

10

Geprüft auf die Empfindlichkeit gegen Angriff durch die Gewebeprotease Plasmin wurden die Peptidleitstruktur  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  und deren Modifikationen an der Position 23  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  (Ornithin),  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Dab}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  (2,4-Diaminobuttersäure),  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Dap}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  (2,3-Diaminopropionsäure),  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  (Norleucin) und  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Arg}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  (Arginin). Die Leitstruktur  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  enthält die aus Urokinase bekannte Plasminspaltstelle, nämlich die Peptidbindung zwischen  $\text{Lys}^{23}$  und  $\text{Tyr}^{24}$ .

20

Figur 5 zeigt HPLC-Profile von Peptidvarianten vor (obere Profile) und nach (untere Profile) Inkubation mit Plasmin. Teilabbildung (A) zeigt die unveränderte Leitstruktur  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  mit Lysin an Position 23, (B) die Ornithin-substituierte Variante  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ , (C) die Diaminobuttersäure-substituierte Variante  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Dab}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ , (D) die Diaminopropionsäure-substituierte Variante  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Dap}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ , (E) die Norleucin-substituierte Variante  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$  und (F) die Arginin-substituierte Variante  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21}\text{Arg}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ . Die Protease Plasmin erscheint in den unteren Profilen jeweils bei ca. 17,5 min.

30

- 20 -

Nach Inkubation von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> mit Plasmin und HPLC-Analyse der Produkte trat neben dem Peak der unveränderten Leitstruktur ein neuer, unbekannter Peak auf. Die Summe beider Peak-Integrale entsprach 93,5 % des Peak-Integrals der unveränderten Leitstruktur. Bei dem neuen Peak handelte es sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Plasmin-Spaltprodukt von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Von den an Position 23 modifizierten Peptiden, die alle in Bezug auf die Konkurrenz mit uPA um die Bindung an den uPAR aktiv waren, erwiesen sich die Diaminbuttersäure-, Ornithin- und Norleucin-substituierten als stabil gegen Plasmin (Figur 5). Bei der Arg<sup>23</sup>-substituierten Variante trat nach Inkubation mit Plasmin ein neuer Peak auf, dessen Retentionszeit mit derjenigen des Plasminmetaboliten der unveränderten Leitstruktur annähernd identisch war, d.h. die Arg<sup>23</sup>-substituierte Variante ist Plasmin-sensibel. Bei der Plasmin-Exposition der Diaminpropionsäure-substituierten Variante traten zwei kleine unidentifizierte Peaks bei ca. 21 min auf. Deren Retentionszeit unterscheidet sich stark von den Retentionszeiten der Plasmin-Metaboliten der Leitstruktur und derjenigen der Arg<sup>23</sup>-Variante. Entsprechend fraglich ist, ob die kleinen 21 min-Peaks tatsächlich spezifische Plasminspaltprodukte der Dap<sup>23</sup>-Variante darstellen.

20

Durch Substitution von Lysin an Position 23 der cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> Leitstruktur durch nicht-proteinogene Aminosäuren kann Stabilität gegen die Gewebeprotease Plasmin erzeugt werden, ohne die biologische Aktivität wesentlich zu verändern.

25

## 2.5 Antiangiogenetische Wirksamkeit

Thorax-Aorten wurden aus 1 bis 2 Monate alten Wistar-Ratten gewonnen und sofort in eine Kulturschale mit serumfreiem Medium (RPMI) überführt. Das Gewebe um die Aorta wurde sorgfältig entfernt. Es wurden 1 mm lange Aortenringe präpariert und gründlich mit serumfreiem Medium gewaschen.

30

- 21 -

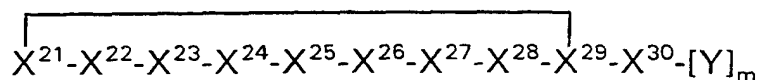
Vor dem Einbetten der Aortenringe in Matrigel wurde der Boden jeder Vertiefung mit 80  $\mu$ l Gellösung beschichtet. Nach Gelbildung wurden die Aortenringe in die Vertiefung überführt, positioniert und durch Überschichten mit 70  $\mu$ l Gellösung befestigt. Nach Gelbildung wurden verschiedene Mengen des jeweiligen Testpeptids in die Vertiefungen gegeben. Als Kontrollen wurden Medium alleine, Medium mit Wachstumszusätzen und Medium mit Wachstumszusätzen und Kontrollpeptid untersucht. Die Kulturen wurden bei 35°C für 5 Tage gehalten und anschließend untersucht.

Die Testpeptide waren cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21-30</sub> und cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Nle<sup>23</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> in Dosierungen von 0,001, 0,1, 1, 10, 25 und 50  $\mu$ g/ml. Die Testpeptide zeigten deutliche anti-angiogenetische Wirkungen im in vitro Gewebekulturtest. Eine Hemmung der Kapillarbildung wurde im Konzentrationsbereich von etwa 1  $\mu$ g/ml und höher gefunden. Das Sprossen von Kapillaren, d.h. die Anzahl und Länge neu gebildeter Kapillaren konnte im Vergleich mit unwirksamen Kontrollpeptiden bei einer Peptidkonzentration von 30  $\mu$ g/ml um etwa den Faktor 3 bis 4 verringert werden.

### Ansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):

5



10

worin  $X^{21}-X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21} = \text{D-Cys}$ ,  $X^{22} = \text{Asn}$ ,  $X^{23} = \text{Lys}$ ,  $X^{24} = \text{Tyr}$ ,  $X^{25} = \text{Phe}$ ,  $X^{26} = \text{Ser}$ ,  $X^{27} = \text{Asn}$ ,  $X^{28} = \text{Ile}$ ,  $X^{29} = \text{Cys}$  und  $X^{30} = \text{Trp}$  abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}-X^{30}$  der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebenen Aminosäurereste ersetzt ist:

15

20

$X^{21}$ : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure (Dab), Penicillamin (Pen), D-Pen, Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

$X^{22}$ : Gln, Asp, Glu;

25

$X^{23}$ : Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

$X^{24}$ : Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal) Cha (Cyclohexylalanin);

30

$X^{25}$ : Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

$X^{26}$ : Thr, Val, Homoserin (Hse);

$X^{27}$ : Gln, Asp, Glu;



- 23 -

X<sup>28</sup>: Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle),  
Norvalin (Nva), Nle,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib);  
X<sup>29</sup>: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;  
X<sup>30</sup>: Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure  
(Oic), His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Tryptamin (Trp-NH<sub>2</sub>).

2. Verbindungen nach Anspruch 1,

**dadurch gekennzeichnet,**

daß mindestens einer der Aminosäurereste X<sup>21</sup>-X<sup>30</sup> der Leitstruktur  
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

X<sup>21</sup>: D-Pen;

X<sup>22</sup>: Gln;

X<sup>23</sup>: Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

X<sup>24</sup>: Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

X<sup>25</sup>: Thi;

X<sup>27</sup>: Asp;

X<sup>28</sup>: Nle, Val, Cha;

X<sup>29</sup>: Pen;

X<sup>30</sup>: Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia, Trp-NH<sub>2</sub>.

3. Verbindungen nach Anspruch 1,

**dadurch gekennzeichnet,**

daß mindestens einer der Aminosäurereste X<sup>21</sup>-X<sup>30</sup> der Leitstruktur  
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

X<sup>21</sup>: D-Pen;

X<sup>23</sup>: Arg, Nle, Cit, Hci;

X<sup>24</sup>: Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

X<sup>25</sup>: Thi;

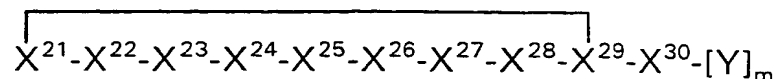
X<sup>28</sup>: Nle, Cha;

X<sup>29</sup>: Pen;

X<sup>30</sup>: Trp-NH<sub>2</sub>.

- 24 -

## 4. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



5        worin  $X^{21}$ - $X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbon-  
 säurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  
 $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  
 $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind, Y ein  
 10        Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -  
 CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils  
 unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und  
 pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,  
 ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ -  
 $X^{30}$  der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest  
 15        ersetzt ist.

5. Verbindungen nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
 daß sie eine erhöhte Proteasestabilität im Vergleich zur Leitstruktur  
 20        aufweisen.

6. Verbindungen nach Anspruch 4 oder 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
 daß Lys<sup>23</sup> durch eine nicht-proteinogene Aminosäure ersetzt ist.

25        7. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
 daß mindestens 2 der Aminosäurereste  $X^{22}$ ,  $X^{23}$ ,  $X^{24}$ ,  $X^{25}$ ,  $X^{26}$ ,  $X^{27}$ ,  
 $X^{28}$  und  $X^{30}$  eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher  
 30        Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

- 25 -

8. Verbindungen nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß mindestens 2 der Aminosäurereste  $X^{24}$ ,  $X^{25}$ ,  $X^{28}$  und  $X^{30}$  die  
gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

5

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens  
eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gegebenenfalls  
zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder  
Verdünnungsmitteln enthält.

10

10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1-8 zur  
Herstellung eines uPAR-Antagonisten.

15

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Bekämpfung von mit der  
Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur  
Tumorbekämpfung.

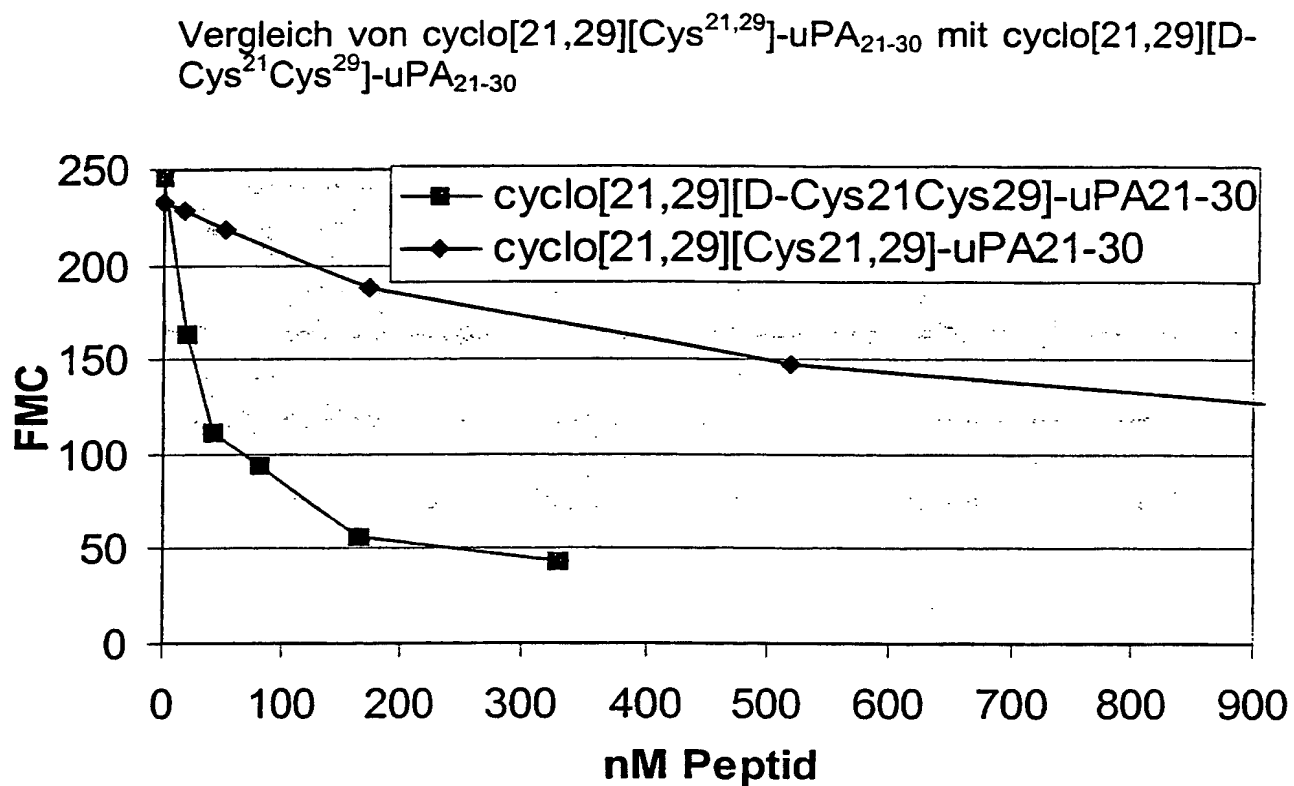
20

12. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur  
Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.
13. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur  
Herstellung eines Angiogenese-Inhibitors.



- 1/12 -

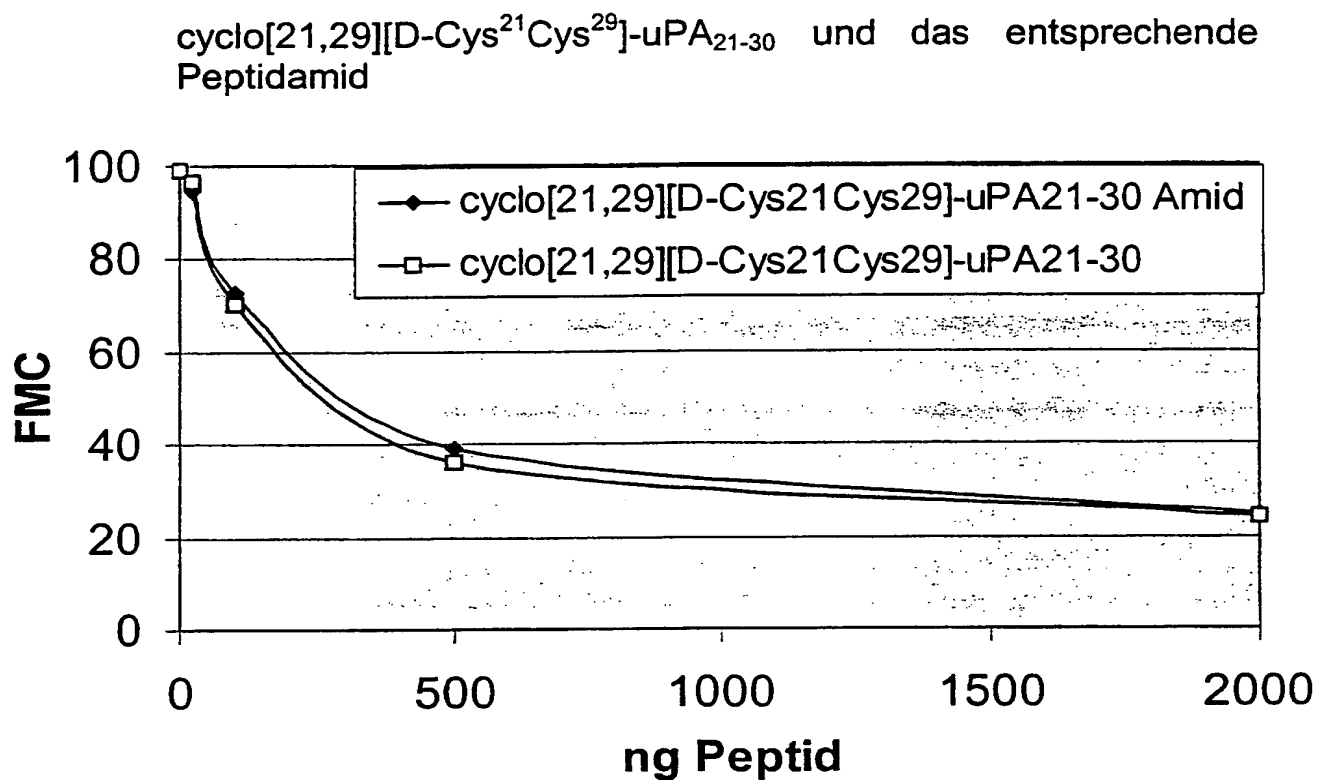
Fig. 1a





- 2/12 -

Fig. 1b







- 3/12 -

Fig. 2

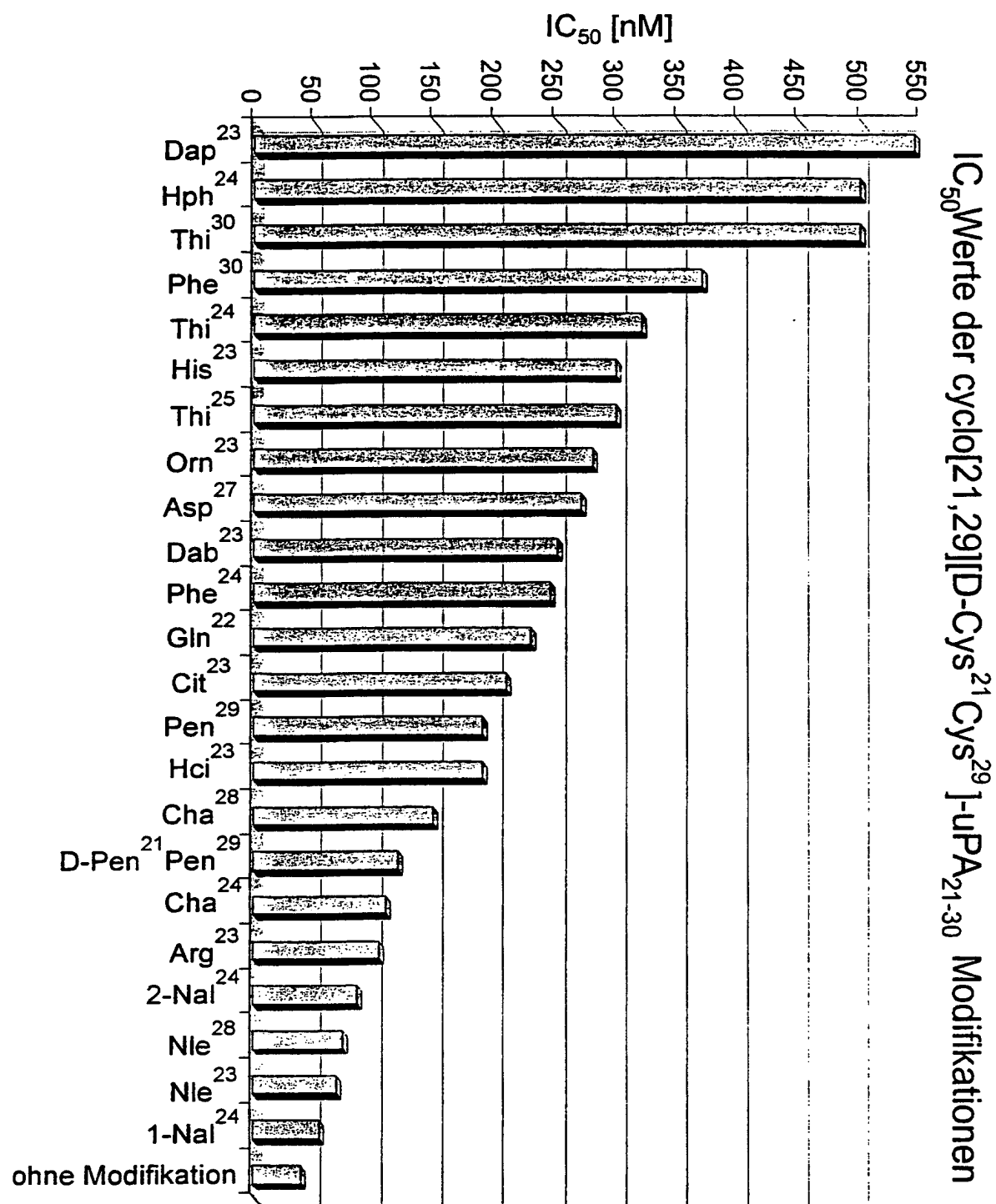
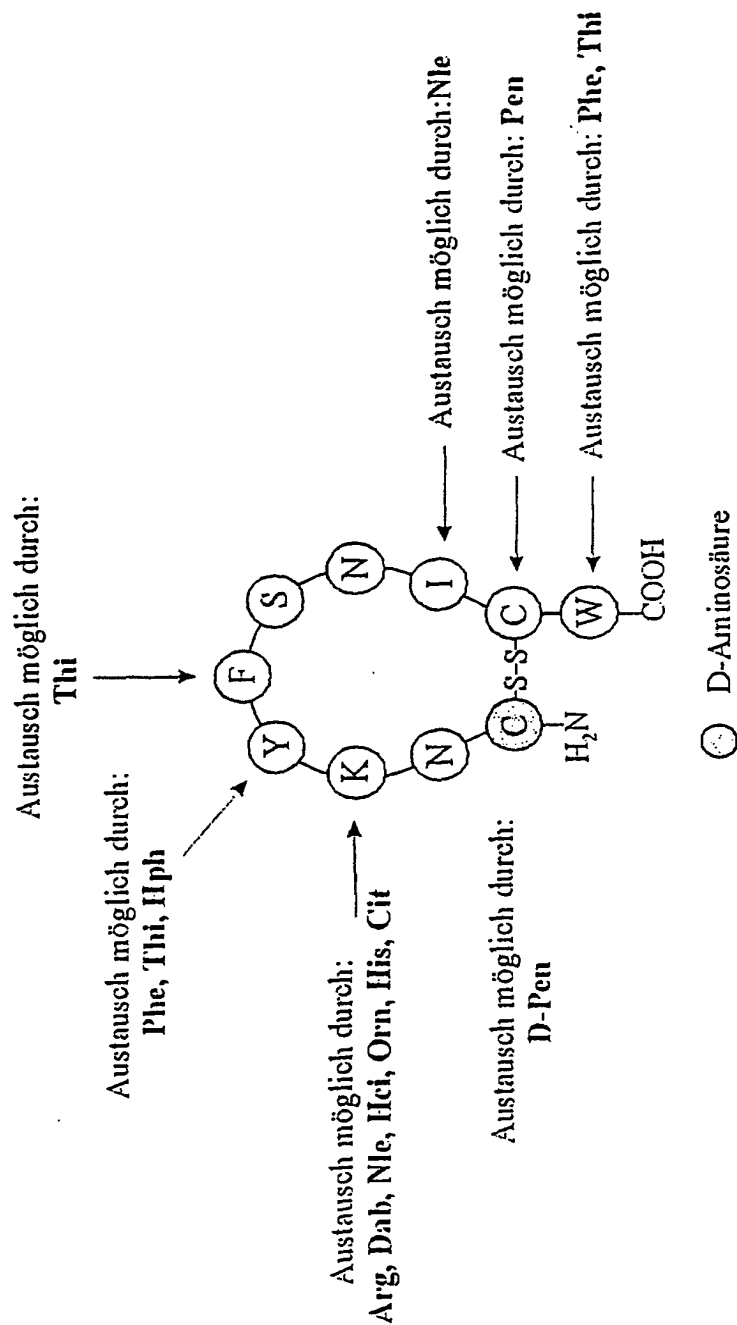




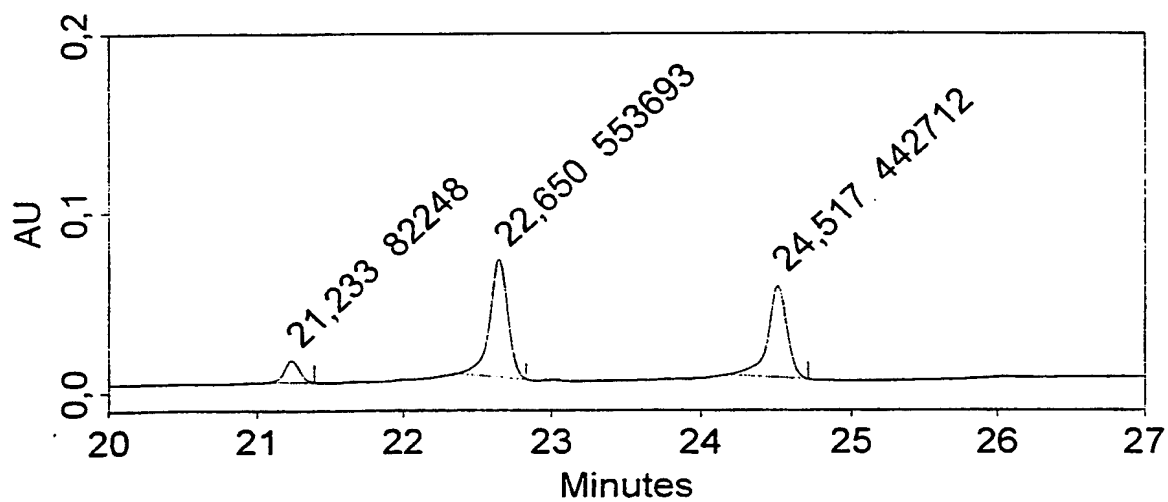
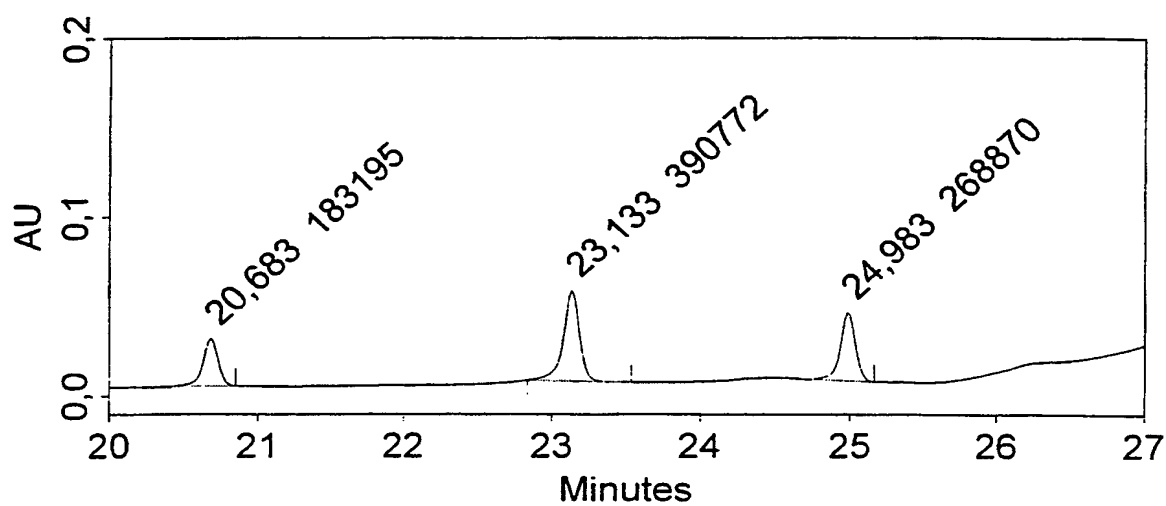
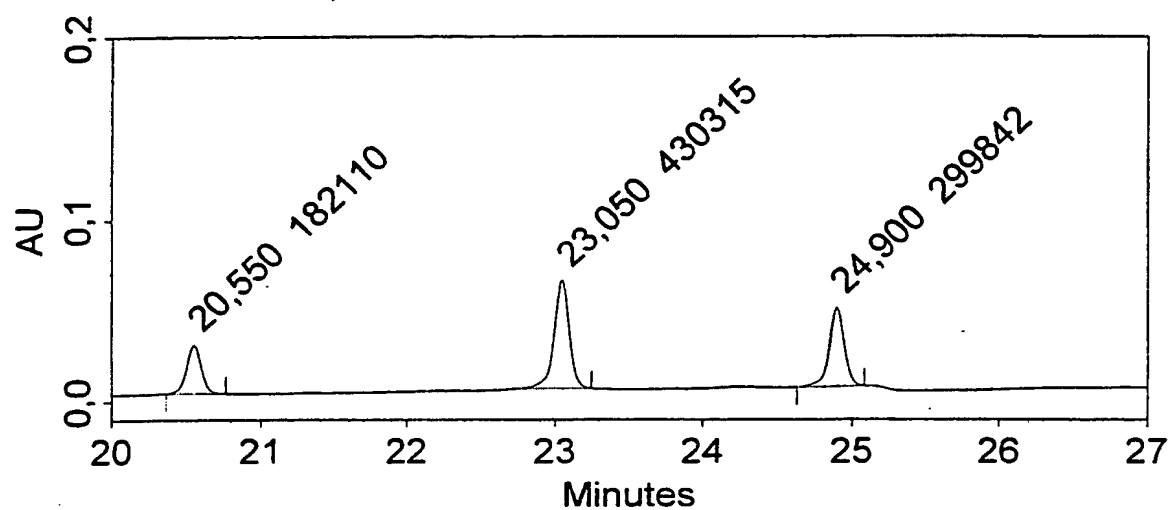
Fig. 3





- 5/12 -

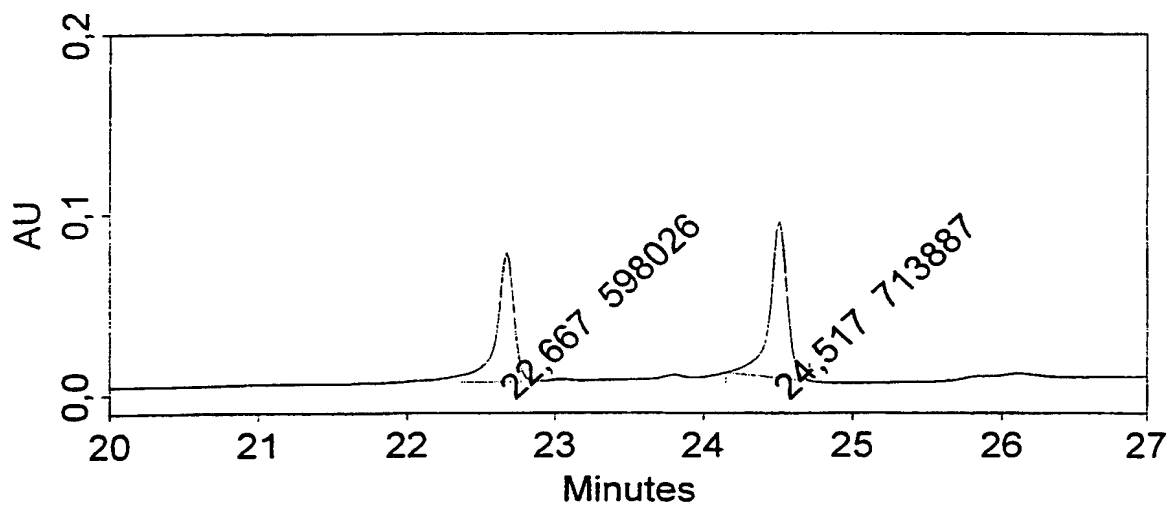
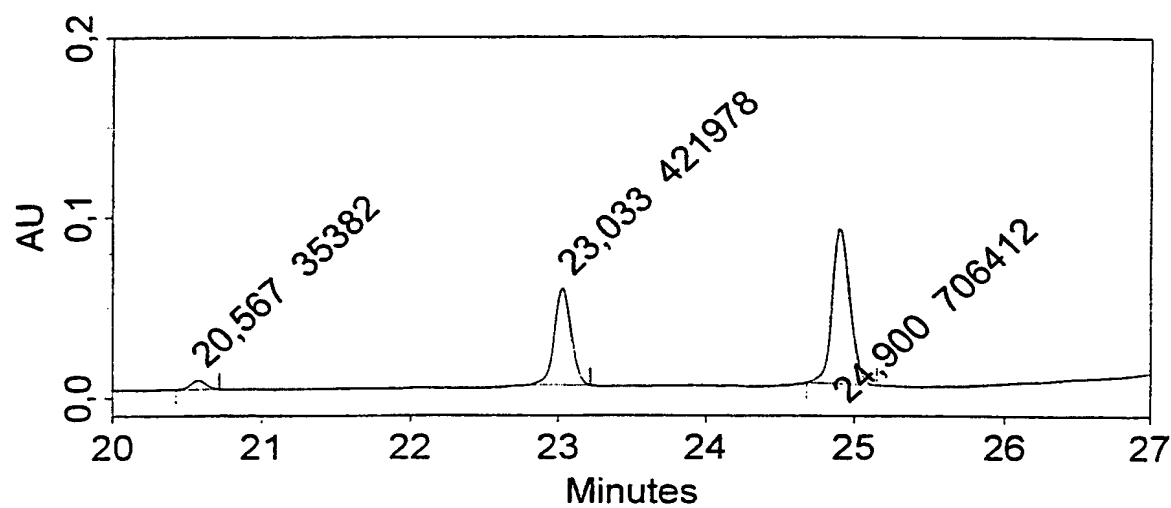
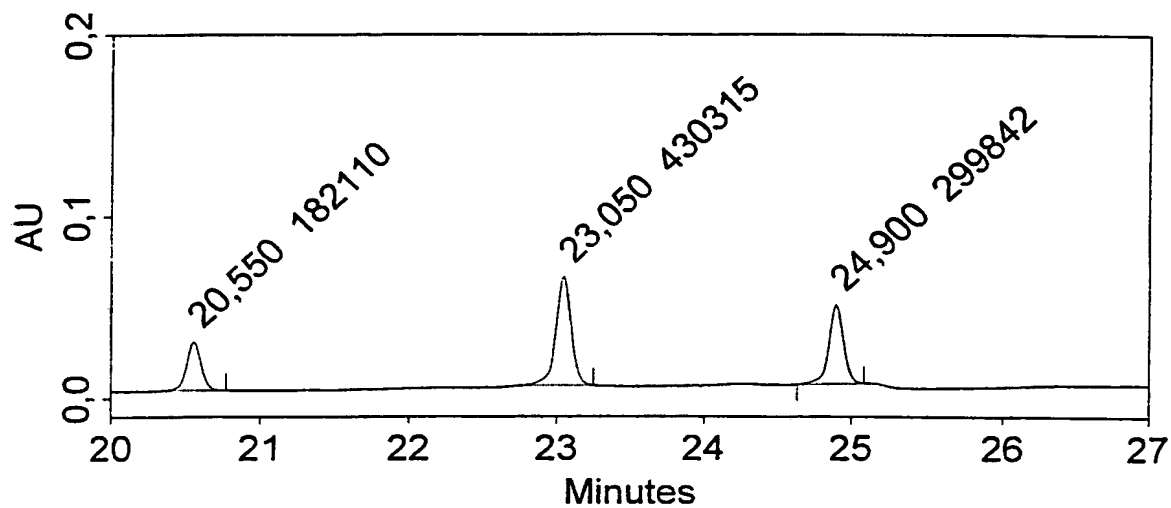
Fig. 4a





- 6/12 -

Fig. 4b

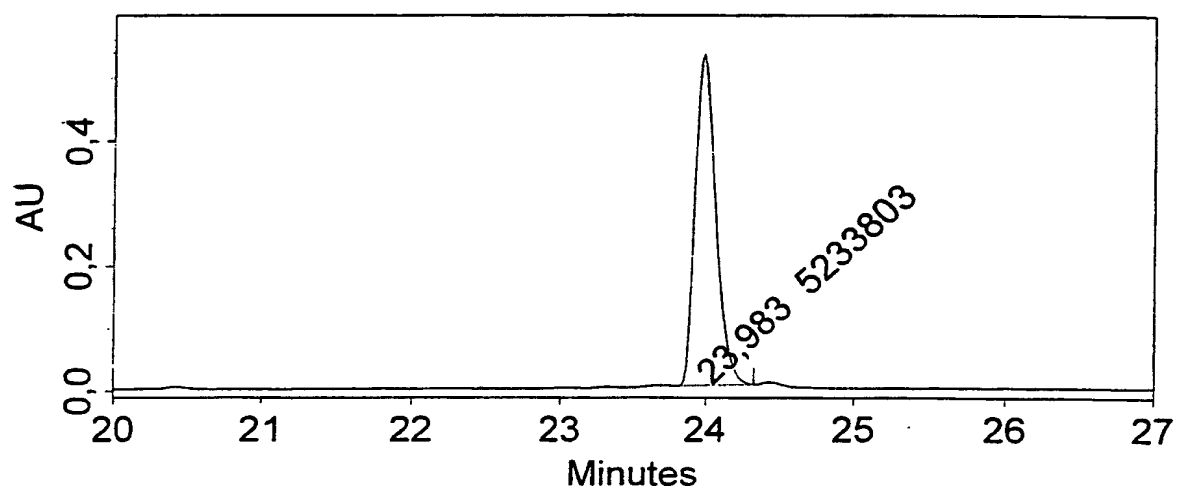
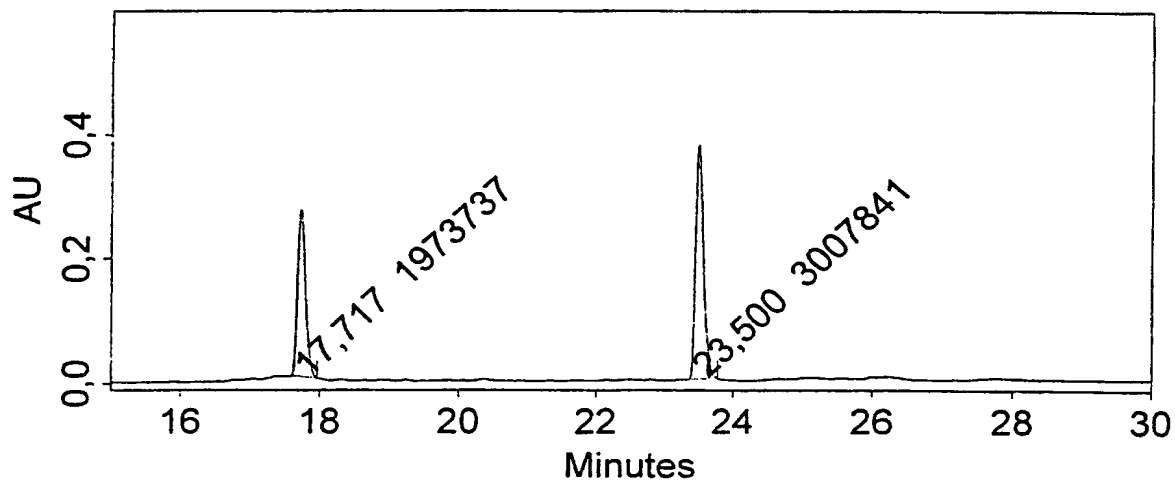






- 7/12 -

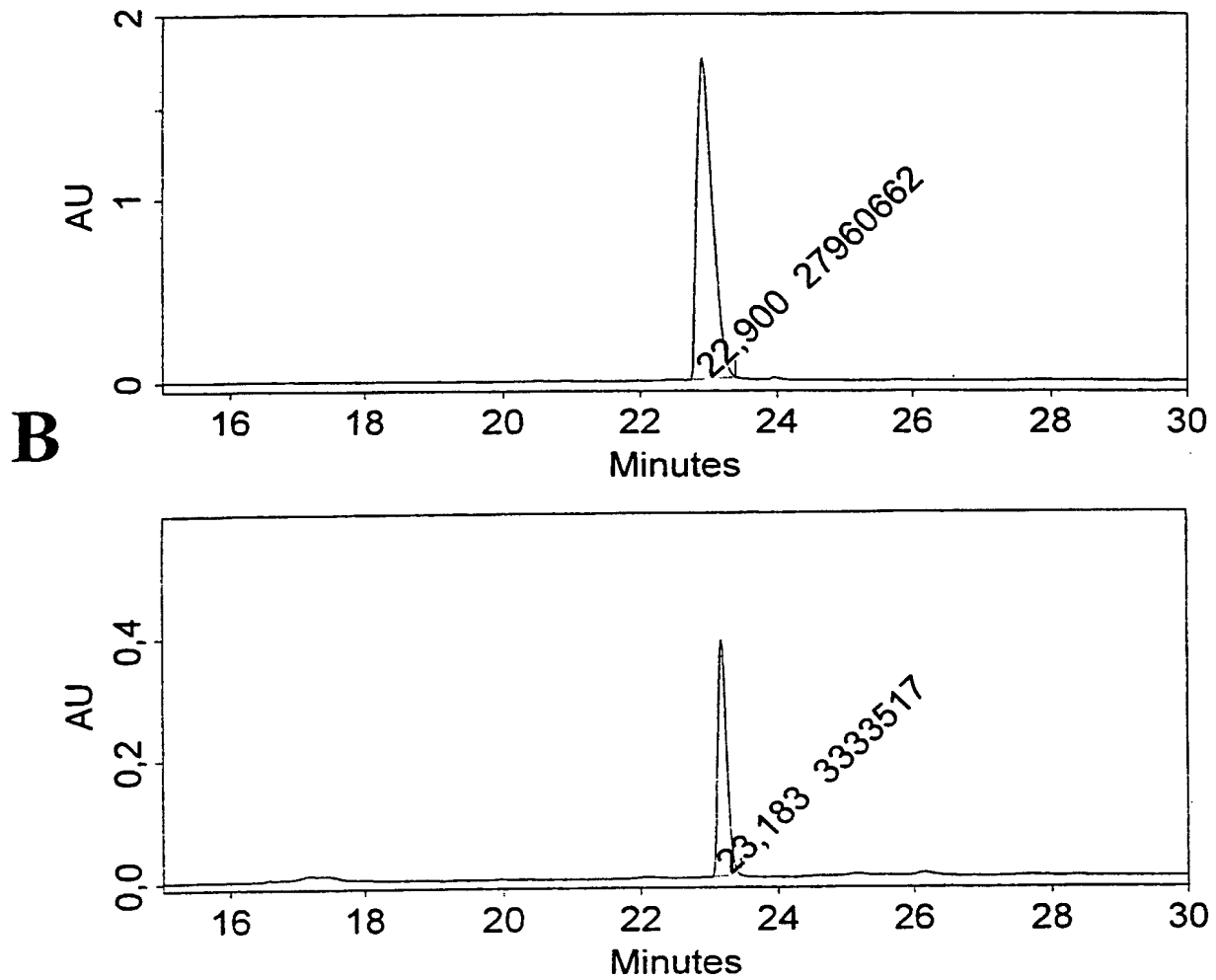
Fig. 5

**A**



- 8/12 -

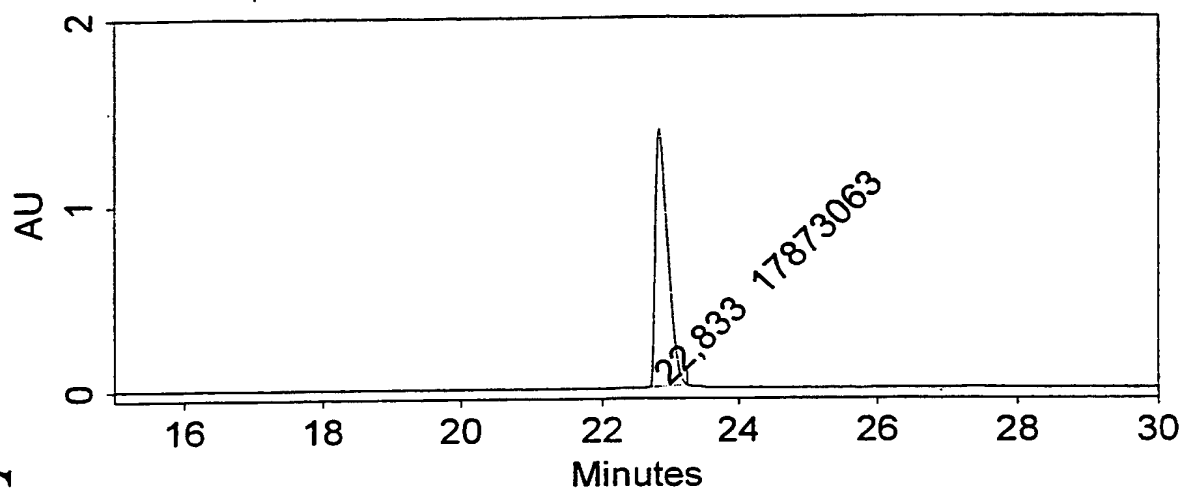
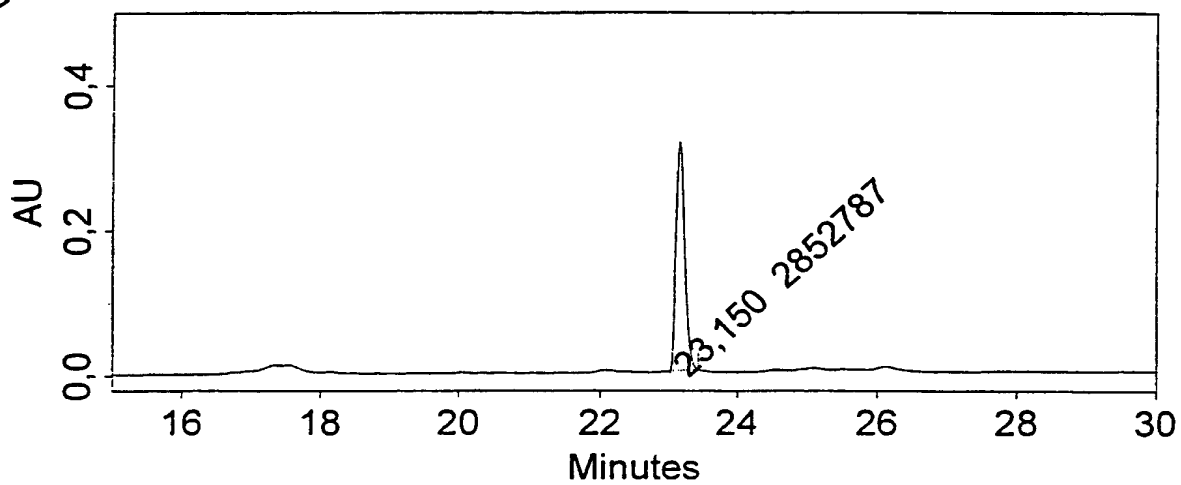
Fig. 5  
(Fortsetzung)





- 9/12 -

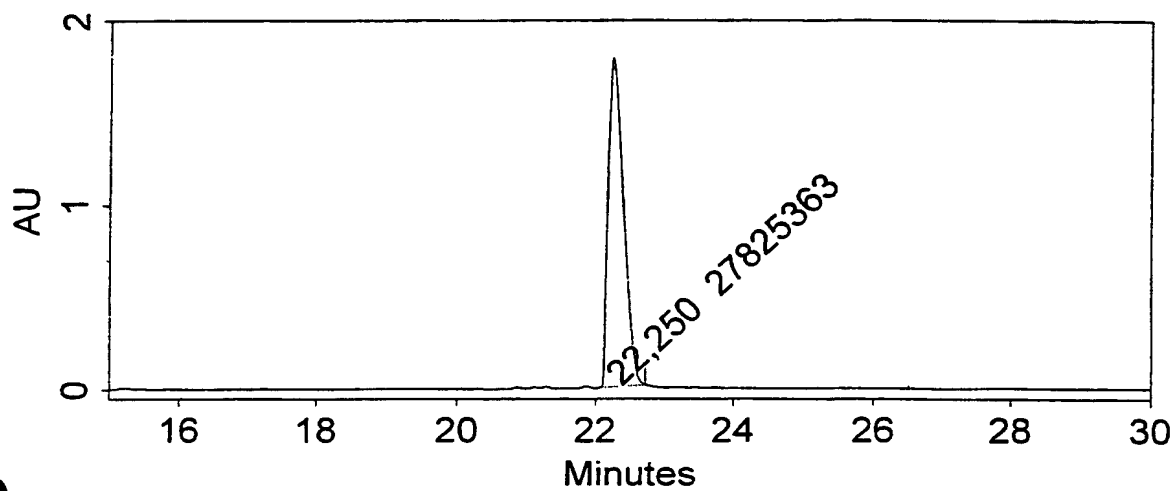
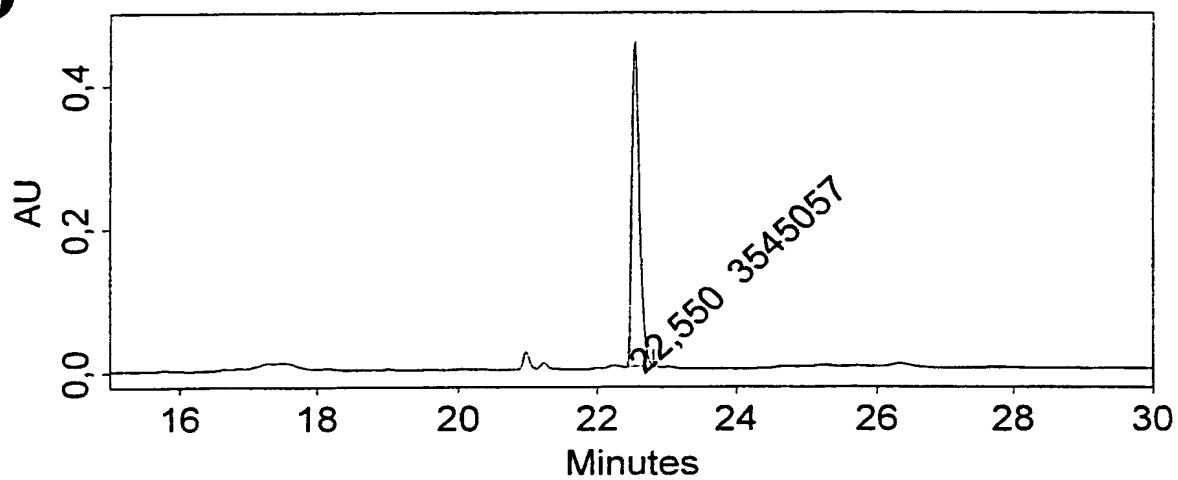
Fig. 5  
(Fortsetzung)

**C**



- 10/12 -

Fig. 5  
(Fortsetzung)

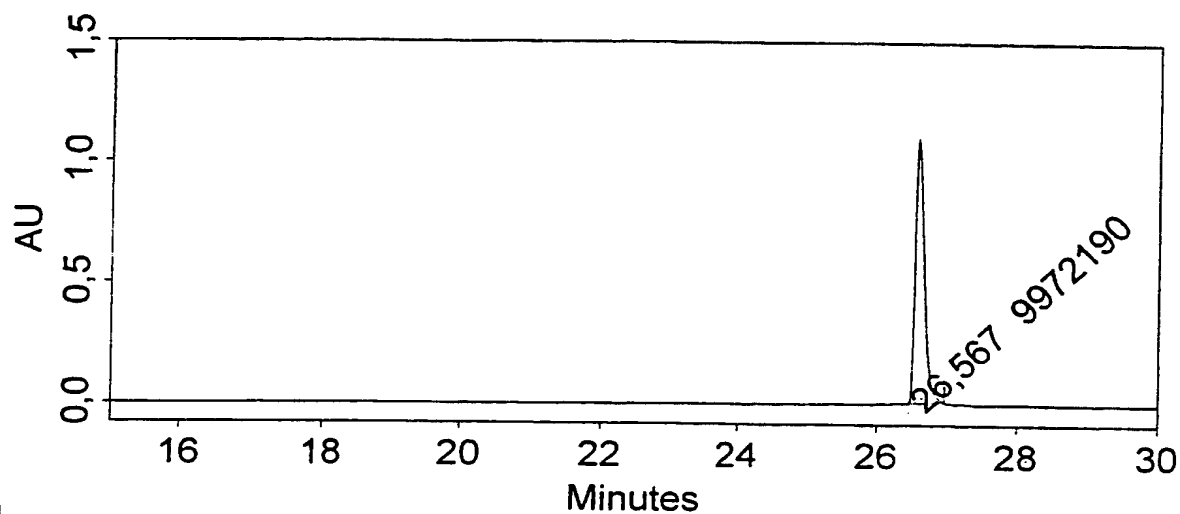
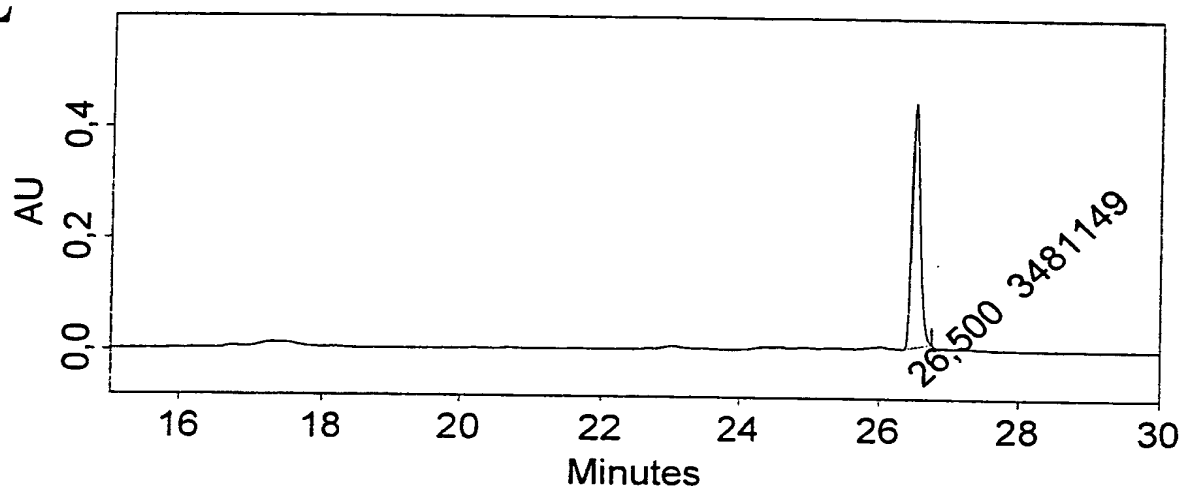
**D**





- 11/12 -

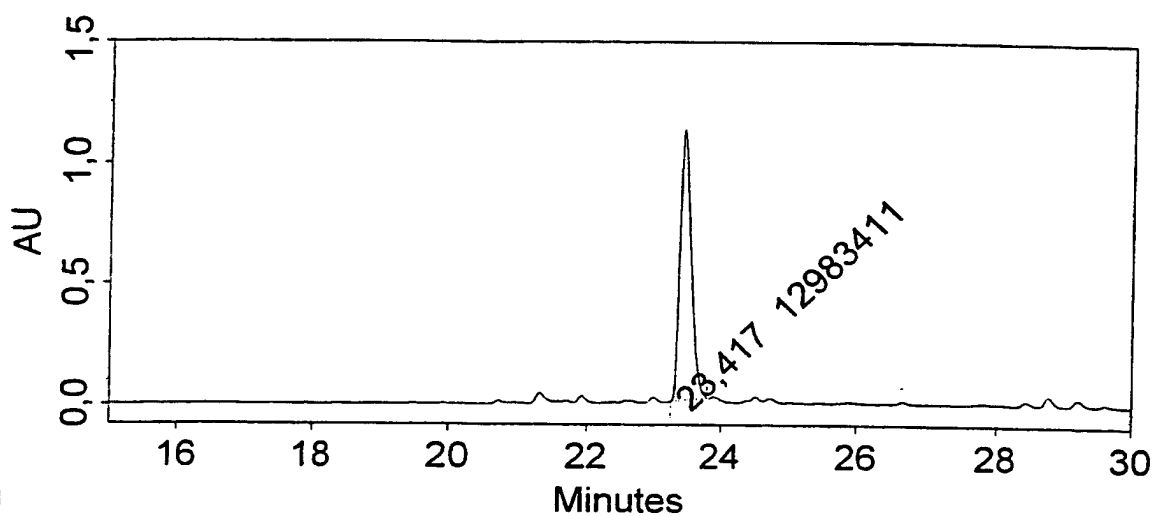
Fig. 5  
(Fortsetzung)

**E**



- 12/12 -

Fig. 5  
(Fortsetzung)

**F**